

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA



DOTTORATO DI RICERCA IN MORFOLOGIA CLINICA E
PATOLOGICA
-XXIV CICLO-

Coordinatore: Prof.ssa Stefania Montagnani

*Valutazione molecolare e prognostica
dei carcinomi di testa-collo HPV-associati*

RELATORE

Ch.mo Prof.
Stefania Staibano

CANDIDATO

Dott.
Gennaro Ilardi

Anno Accademico 2010-2011

INDICE

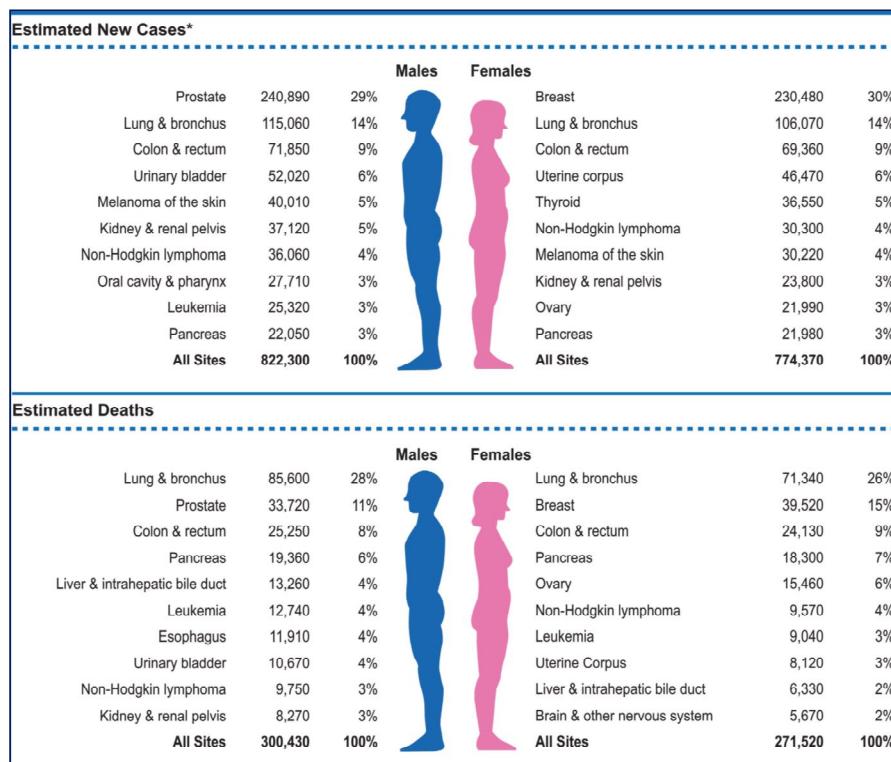
1.	INTRODUZIONE	<i>pag. 3</i>
1.1	<i>Epidemiologia e fattori di rischio</i>	<i>pag. 3</i>
1.2	<i>Infezione da HPV nella cancerogenesi del cavo orale</i>	<i>pag. 6</i>
1.3	<i>Alterazioni epigenetiche nella cancerogenesi del cavo orale: riassemblaggio cromatinico</i>	<i>pag. 8</i>
2.	MATERIALI E METODI	<i>pag. 12</i>
2.1	<i>Popolazione studio</i>	<i>pag. 12</i>
2.2	<i>Tissue Micro Arrays</i>	<i>pag. 12</i>
2.3	<i>Immunoistochimica</i>	<i>pag. 13</i>
2.4	<i>Ricerca e tipizzazione dell' HPV</i>	<i>pag. 16</i>
2.5	<i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 18</i>
3.	RISULTATI	<i>pag.19</i>
3.1	<i>Popolazione studio</i>	<i>pag. 19</i>
3.2	<i>Espressione di CAF1/p60 nella popolazione studio</i>	<i>pag. 20</i>
3.3	<i>Espressione di CD166 nella popolazione studio</i>	<i>pag. 20</i>
3.4	<i>Espressione di Nestina nella popolazione studio</i>	<i>pag. 20</i>
3.5	<i>Espressione di CD133 nella popolazione studio</i>	<i>pag. 21</i>
3.6	<i>Espressione di CD44 nella popolazione studio</i>	<i>pag. 21</i>
3.7	<i>Analisi statistica</i>	<i>pag. 22</i>
4.	DISCUSSIONE	<i>pag. 23</i>
5.	BIBLIOGRAFIA	<i>pag. 29</i>
6.	TABELLE	<i>pag. 36</i>
7.	ICONOGRAFIA	<i>pag. 40</i>

1.INTRODUZIONE

1.1 Epidemiologia e fattori di rischio

I tumori maligni del cavo orale, costituiti per il 90% da carcinomi squamocellulari (OSCC: oral squamous cell carcinoma), rappresentano, a livello mondiale, circa il 4-8% di tutte le neoplasie maligne, rivestendo il sesto posto per incidenza ^[1].

Le differenze, per aree geografiche, per incidenza e mortalità sono estremamente marcate, con tassi particolarmente elevati in India (33 casi/100.000 abitanti) ed in Europa Occidentale (Francia Occidentale). Negli Stati Uniti, l'American Cancer Society ha previsto per il 2011 circa 27.710 nuovi casi di OSCC (circa il 3% di tutte le neoplasie maligne), e circa 5.400 decessi. ^[2] (Fig.1)



Siegel R, et al. Cancer Statistics, 2011. CA.Cancer J Clin, 2011

Fig.1 Incidenza e mortalità del carcinoma del cavo orale negli USA

In Italia, sono stati censiti dal 2006 ad oggi circa 106.727 nuovi casi di OSCC, con andamento decrescente dei tassi di incidenza da Nord a Sud, e picchi di frequenza nelle regioni nord-orientali (Friuli Venezia Giulia, Veneto e Trentino-Alto Adige). ^[3] (Fig. 2)

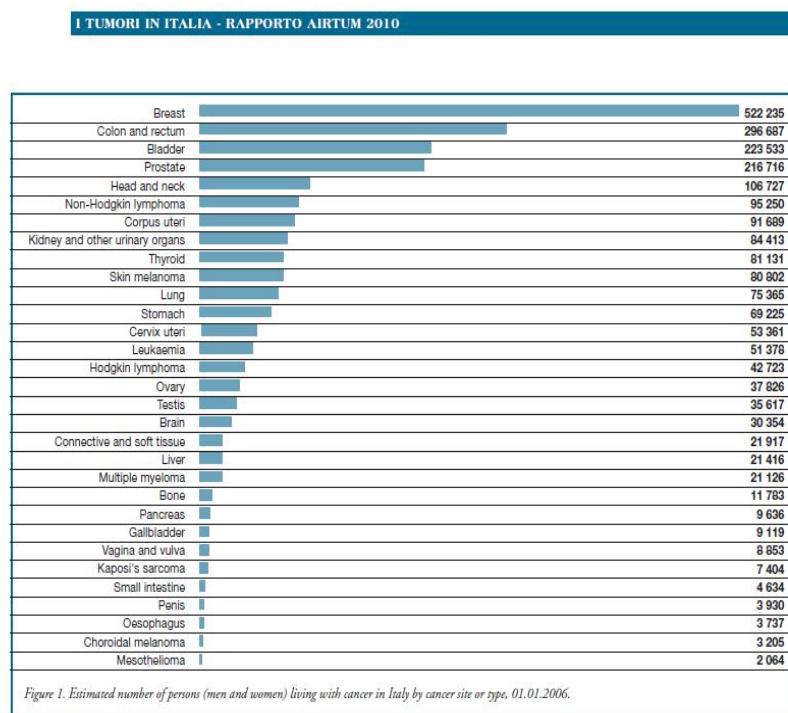


Fig.2 Rapporto AIRTUM 2010 “La prevalenza dei tumori in Italia”

Gli OSCC colpiscono prevalentemente i maschi, di età compresa fra i 50 ed i 60 anni (Fig. 3). Tuttavia la diffusione dell’abitudine al fumo e al consumo di alcool in giovane età, ha fatto sì che si registri un secondo picco di incidenza in una fascia più giovane, compresa tra i 20 ed i 30 anni, con un relativo incremento nel sesso femminile ^[4].

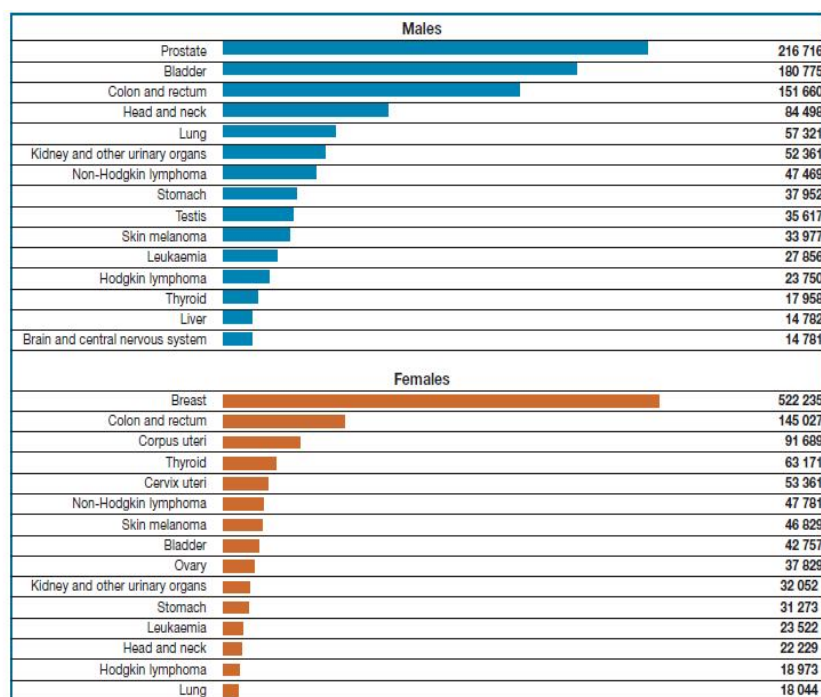


Fig.3 Rapporto AIRTUM 2010 “La prevalenza dei tumori in Italia”

Nonostante la diffusione della prevenzione primaria e dei programmi di screening, e la disponibilità di un trattamento chirurgico e radioterapico sempre più personalizzati, la mortalità dei pazienti con OSCC è rimasta sostanzialmente invariata negli ultimi venti anni ^[1]. Classicamente la sopravvivenza dei pazienti dipende dallo stadio della neoplasia, per cui la diagnosi precoce e una terapia tempestiva continuano ad essere essenziali nell’outcome dei pazienti.

E’ pertanto indispensabile, al fine di una più precoce identificazione, una migliore conoscenza dei meccanismi alla base della cancerogenesi orale nonchè dei fattori di rischio e delle condizioni preneoplastiche associate. Recenti studi indicano che, accanto ai classici fattori di rischio quali uso di tabacco ed alcool, una dieta povera di fibre e vitamine ed una non corretta igiene orale ^[1,5,6,7,8], l’infezione persistente da papillomavirus umano (HPV) rappresenta un fattore predisponente l’insorgenza di questi tumori.^[9]

1.2 Infezione da HPV nella cancerogenesi del cavo orale

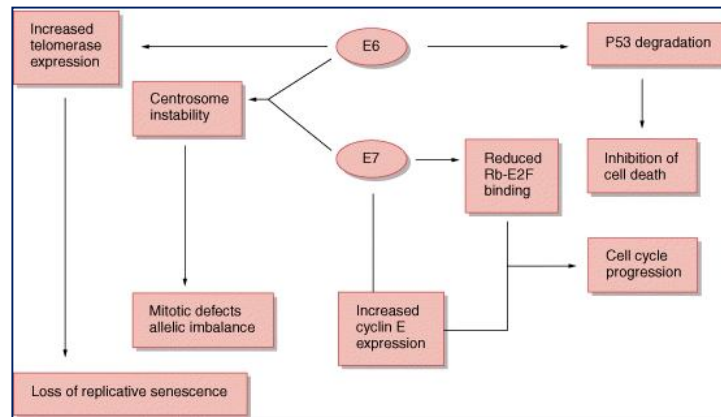
L'associazione tra insorgenza di OSCC e infezione da HPV fu postulata per la prima volta da Syrjanen nel 1983.^[12] Da una recente meta-analisi è emerso che il genotipo virale prevalente in questa classe di lesioni è il 16, che è associato a circa l'87% di tutti i tumori HPV positivi.^[9] L'infezione è correlata a comportamenti sessuali a rischio, in particolare pratiche di sesso orale, mentre non è descritta una rilevante associazione con l'abitudine al fumo e l'uso di alcolici.^[13, 14]

I carcinomi squamosi del cavo orale HPV-associati differiscono per caratteristiche cliniche, molecolari e comportamento biologico dalle neoplasie HPV-negative.^[15]

Dal punto di vista clinico, i carcinomi HPV-positivi originano perlopiù dall'orofaringe e tendono a presentarsi in una fase avanzata di malattia, già metastatizzata ai linfonodi; istologicamente, sono generalmente lesioni di alto grado (G3).^[16, 17]

Dal punto di vista molecolare, le neoplasie HPV-associate sono caratterizzate da una elevata instabilità genomica, riconducibile ad una alterata regolazione del controllo del ciclo cellulare, indotto dalle oncoproteine HPV E6 ed E7.^[18]

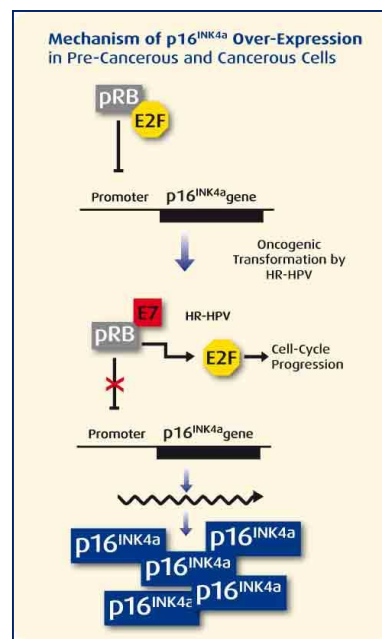
In dettaglio, la proteina virale E6 induce degradazione mediante proteolisi ubiquitina mediata di p53 che, quando attiva, costituisce uno dei principali meccanismi di controllo dell'integrità del genoma, mediante l'induzione di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare, nel riparo del DNA o in alternativa nella senescenza/apoptosi.^[10] La proteina E7, d'altro canto, lega ed inattiva la proteina del retinoblastoma (pRb), attivando le chinasi ciclina-dipendenti (cdk4 o cdk6), bypassando i normali checkpoint. La degradazione di pRb causa, mediante un meccanismo di feedback positivo, l'aumento intracellulare della proteina p16^{ink4a}.^[19] (Fig.4)



BMC, Infectious Diseases 2009, 9:119

Fig.4 Meccanismo d'azione delle oncoproteine E6 ed E7

Pertanto l'overespressione di p16 è considerata un marker surrogato di infezione virale "trasformante" da HPV.^[20] (Fig. 5)



<http://www.mtm-laboratories.com>

Fig.5 Meccanismi alla base della overespressione di p16^{INK4a}

Da un punto di vista prognostico i carcinomi squamosi HPV-associati, se confrontati con casi di pari grado e stadio negativi per infezione virale, sono caratterizzati da una progressione significativamente più lenta e da una maggiore responsività ai trattamenti chemio- e radioterapici.^[21, 22]

1.3 Alterazioni epigenetiche nella cancerogenesi del cavo orale: riassetto cromatinico

E' ormai noto che le alterazioni epigenetiche rivestono un ruolo significativo nella regolazione dell'espressione di geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e della riparazione dei danni del DNA nell'ambito della progressione neoplastica. Decine di modificazioni epigenetiche consentono di norma la corretta regolazione dell'espressione genica; l'acetilazione istonica e la metilazione del DNA sono quelle meglio caratterizzate.^[23]

Le modificazioni post-sintetiche del DNA e delle proteine della cromatina rivestono estrema importanza in quanto, interferendo con la struttura cromatinica, ne determinano il suo rimodellamento, regolando l'accessibilità alle informazioni presenti sul DNA; le alterazioni di questo meccanismo sono coinvolte nella patogenesi ed evoluzione di diverse patologie umane.

Esistono numerosi sistemi di controllo cellulare (Checkpoint Machinery=CPM) che hanno il compito fondamentale di individuare e riconoscere la presenza di danni al DNA, garantendo il mantenimento dell'integrità del genoma e la corretta progressione del ciclo cellulare.^[24] I diversi CPM rispondono al danno del DNA in maniera univoca, bloccando cioè la progressione del ciclo cellulare per il tempo necessario alla riparazione. Questa strategia permette la replicazione e la segregazione di cromosomi altrimenti danneggiati, potenziale causa di instabilità genomica.^[25] In ogni caso, l'identificazione e la riparazione dei danni al DNA si svolgono all'interno del nucleo, nel cosiddetto "*ambiente cromatinico*", costituito da unità di base di DNA spiralizzato intorno ad ottametri istonici (nucleosomi)^[24, 26-27] associati a proteine cromatiniche non istoniche ed a proteine leganti gli istoni.^[26]

La regolazione della spiralizzazione della cromatina serve non solo a compattare il DNA all'interno del nucleo, ma partecipa attivamente alla replicazione cellulare, alla riparazione del DNA ed alla regolazione dell'espressione genica.^[27]

Uno dei più efficienti regolatori epigenetici del processo di replicazione cellulare e del DNA repair ad esso connesso è costituito dal complesso CAF-1 (fattore 1 di assemblaggio cromatinico),^[28] un complesso proteico formato da tre subunità a differente peso molecolare p48, p60 e p150.

CAF-1 è un istone chaperone che media il primo step della compattazione cromatinica attraverso l'assemblaggio dei nucleosomi, legando gli istoni H3 ed H4 al DNA neosintetizzato.^[24, 26-27]

Durante la fase S, è localizzato presso i siti intranucleari di replicazione e la sua forma attiva è presente anche in fase G1/G2; solo in mitosi, si dissocia dalla cromatina e diviene inattivo.^[29]

Questa ripartizione intracellulare di CAF-1 è osservabile per ognuna delle tre subunità proteiche da cui è costituito.^[29, 30]

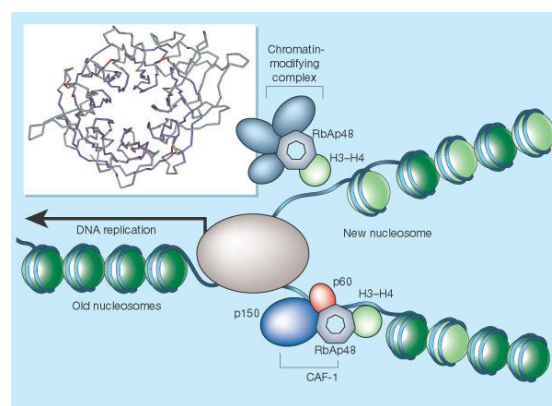
In dettaglio, la subunità p48 (RbAp48) è prevalentemente coinvolta nella regolazione negativa della crescita cellulare mediante stretta collaborazione con la proteina Rb^[26], mentre le altre due subunità svolgono azione regolatrice nei processi di replicazione e riparazione del DNA. La p150 sembra maggiormente attiva nei processi di riparazione, mentre la p60 è più specificamente connessa al controllo della replicazione cellulare. Del tutto recentemente, p60 è stata proposta come nuovo marker di proliferazione cellulare, con un grado di sensibilità maggiore rispetto ai marcatori tradizionali.^[29, 31]

CAF-1 contribuisce al mantenimento della struttura cromosomica prima e dopo la formazione della forcina di replicazione e sembra essere coinvolto nella transitoria destabilizzazione dei nucleosomi richiesta per il passaggio della forcina di replicazione. CAF-1/p60 in particolare è in grado di interferire inoltre indirettamente con la

replicazione, alterando la morfologia tridimensionale del DNA mediante l'introduzione di supereliche negative di DNA da parte dei nucleosomi, che contribuiscono allo svolgimento del DNA che consente la progressione della forcella di replicazione.^[32]

CAF-1 assembla solo DNA che è andato incontro a replicazione. Ciò è dovuto al fatto che la sua attività richiede necessariamente l'interazione con l'Antigene Nucleare di Proliferazione Cellulare (PCNA), che, come è noto, specificamente marca il DNA di nuova sintesi^[31, 33] ed è a sua volta coinvolto nei processi di replicazione, excision repair, ricombinazione, riparazione dei single strand breaks (SSB) e coesione di cromatidi fratelli.^[33]

Mentre CAF-1/p60 è down-regolata nelle cellule quiescenti, essa è overespressa in cellule neoplastiche.^[28] Tale subunità costituisce attualmente quella più studiata in letteratura su tessuti umani ed è stata recentemente proposta come nuovo sensibile marcatore di proliferazione per alcuni tumori solidi umani (carcinoma della mammella, della lingua, adenocarcinoma della prostata, melanoma, e tumori delle ghiandole salivari), nei quali è risultata inoltre direttamente correlata alla prognosi individuale dei pazienti.^[28, 34-37] (Fig. 6)



Henikoff S. Versatile assembler. *Nature*. 2003 Jun 19;423(6942):814-17

Fig 6: Struttura e meccanismo d'azione di CAF-1

In letteratura si moltiplicano le segnalazioni che sostengono la teoria delle “*cancer stem cells*”(CSCs), che ipotizza che soltanto una frazione di cellule nell'ambito di un

tumore, le CSCs appunto, sono essenziali per la sua progressione. Queste cellule sono caratterizzate, in primis, dalla loro capacità di replicarsi attraverso “auto-renewal”. Inoltre, hanno elevata capacità proliferativa^[38] e tendono ad essere più resistenti agli agenti citotossici delle cellule mature; caratteristica che può essere correlata alla loro relativa quiescenza, all’ attivazione di meccanismi anti-apoptotici o all’ elevata espressione di *ATP-binding cassette transporters* (ABC).^[39-41]

Pertanto, considerata l’ipotesi, oramai sempre più sostenuta, che i tumori maligni metastatizzanti hanno alla base una frequente derivazione staminale, ed essendo noto che le cellule staminali sono resistenti ai danni del DNA, quindi responsabili della radio e chemio resistenza nella fase metastatica, abbiamo provato a valutare se effettivamente la presenza di cellule staminali sia in grado di discriminare, nell’ambito di una serie selezionata di OSCC, quei casi che presenteranno un fenotipo metastatizzante e/o una prognosi sfavorevole. In un secondo step, abbiamo quindi valutato se i tumori con “*fenotipo staminale*” fossero correlati o meno alla presenza di infezione da HPV ed esprimessero un’anomala attività di CAF1/p60. A tale scopo, abbiamo fatto una valutazione comparativa dell’ espressione dei markers indagati tra i due gruppi di lesioni, HPV-positive e negative.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Popolazione studio

Sono stati selezionati dall'Archivio della Sezione di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Biomorfologiche e Funzionali dell' Università "Federico II" di Napoli, 66 casi di OSCC diagnosticati tra Gennaio 2000 e Luglio 2009 (45M, 21 F; età media dei pazienti: 59. anni; range 26-62 anni). Tutti i campioni erano stati fissati in formalina ed inclusi in paraffina. 8/66 (12,12%) erano costituiti da carcinomi ben differenziati (G1), 22/66 (33,33%) moderatamente differenziati (G2) e 36/66 (54,55%) scarsamente differenziati (G3).

Per ciascun caso, è stato selezionato un blocco di tessuto incluso in paraffina rappresentativo del tumore, ed è stata tagliata e colorata una sezione di 5 micron di spessore, con ematossilina/eosina, per confermare la diagnosi istologica originale, il grading delle lesioni in esame e per selezionare l'area più rappresentativa da utilizzare per campionamento per micro-array.

2.2 Tissue Micro Array

La tecnica dei Tissue Microarrays (TMA) consente di investigare in modo simultaneo, efficiente e rapido numerosi campioni, provenienti anche da diversi tipi di tessuti. La tecnica TMA ,descritta per la prima volta nel 1998 dallo staff di J. Kononen, utilizza un sistema di campionamento in grado di prelevare piccole quantità di tessuto di dimensioni e forma regolari, che possono essere disposti più facilmente e con una densità maggiore, secondo uno schema matriciale. Con un sistema di "carotaggio" tramite un apposito ago cavo, piccole biopsie (core) di dimensioni variabili vengono prelevate da blocchi di tessuto fissati in formalina ed inclusi in paraffina (blocchetti donatori) e poi allineate,

secondo una struttura matriciale, in un nuovo blocchetto di paraffina (blocchetto ricevente). Con un microtomo sono, quindi tagliate più sezioni del blocco TMA, con le quali si allestiscono altrettanti vetrini. (Fig.7)

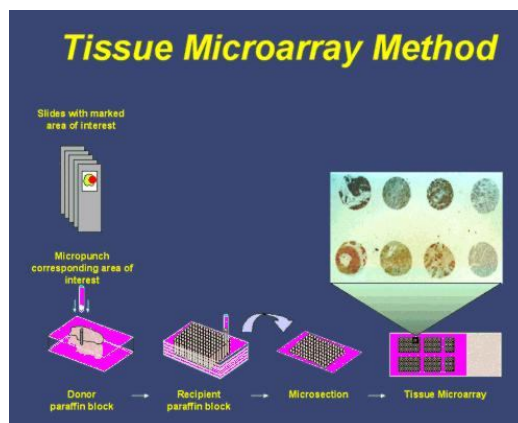


Fig.7 Metodo classico per preparazione di tissue microarray, Sunnybrook research institute

2.3 Immunoistochimica

Per ogni campione, sia dai blocchetti routinari di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina che dai blocchetti di TMA allestiti, sono state tagliate sezioni di 4 μm di spessore per colorazione immunoistochimica e sono state montate su vetrini polilysinati e trattate con metodica immunoistochimica standard, dopo sparaffinatura in xilene e reidratazione mediante scala degli alcoli fino all'acqua distillata deionizzata; in breve l'attività della perossidasi endogena è stata inibita con H_2O_2 al 3% per 30 minuti. Successivamente le sezioni sono state trattate con siero bovino diluito all'1% in PBS per 30 min. allo scopo di minimizzare le reazioni aspecifiche. A questo punto è stata effettuata l'incubazione per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario: anti-CAF1/p60 (SS53, ab8133; AbCam; diluizione: 1:400). In seguito è stata applicata la metodica convenzionale biotina-streptavidina (DAKO labeled streptavidin-biotin-complex/horse-radish peroxidase; Carpenteria, CA). L'avvenuta reazione è stata evidenziata con diaminobenzidina allo 0.03% (3-3'-Diaminobenzidine tetrachloride;

Vector Laboratories, Burlingame, CA). Dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state poi montate con un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany). Invece per i seguenti anticorpi primari: anti-CD166 (CD166/ALCAM, Vector, Burlingame, USA; diluizione: 1:100) e anti-nestina (Nestina, Santa Cruz Biotechnology Inc., diluizione: 1:300), anti-CD44 (Clone Spring Bioscience, Koll Center Parkway, Pleasanton, CA; diluizione: 1:100) ed anti-CD133 (AC133, MACS, MiltenyiBiotec, Friedrich-Ebert-Straße, Bergisch Gladbach, Germany; diluizione: 1:200), incubazione sempre per 1 ora a temperatura ambiente, è stato utilizzato un sistema di rivelazione in fosfatasi alcalina. Per questi anticorpi le sezioni sono state trattate in egual modo come descritto precedentemente fatta eccezione per l'utilizzo del Levamisole che inibisce la fosfatasi alcalina endogena e l'utilizzo di un anticorpo secondario biotinilato e della streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina. L'avvenuta reazione è stata evidenziata con il cromogeno fast-red, che ha evidenziato la presenza antigenica da noi ricercata in rosso (Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse). Anche in questo caso, dopo un debole contrasto nucleare con ematossilina, le sezioni sono state poi montate con un mezzo sintetico (Entellan; Merck, Darmstadt, Germany).

Per ogni seduta di colorazione immunoistochimica, per ciascuno degli anticorpi valutati, sono stati effettuati controlli positivi e negativi, utilizzando per CAF-1/p60 sezioni di carcinoma mammario infiltrante^[28], per CD44 sezioni relative a linfonodi positivi per linfoma, per p16 sezioni di carcinoma squamoso della cervice uterina, di alto grado, per CD 133 e CD166 cute con ricca rappresentazione degli annessi, e per nestina sezioni di glioma. E' stato considerato positivo un definito segnale marrone a localizzazione nucleare per CAF-1/p60, nucleare e talora citoplasmatico per p16^{Ink4a}, citoplasmatico per nestina, di membrana per CD44, di membrana e citoplasmatico per CD166 e CD133.

L'immunopositività è stata valutata come percentuale di cellule immunoreattive sul totale di cellule neoplastiche presenti in 10 campi rappresentativi a forte ingrandimento.

L'indice di positività per CAF-1/p60 è stato espresso semiquantitativamente secondo il seguente score: 0 (<5% di cellule positive); + (5%-<15%); ++ (15%-<30%); +++ ($\geq 30\%$);

L'indice di positività per p16^{Ink4a} è stato espresso in base ad un sistema binario composto da valutazioni "positive" e "negative". In analogia a quanto avviene per le biopsie cervicali, si assegna una valutazione "positiva" se il campione su vetrino colorato con p16^{Ink4a} mostra una colorazione continua di cellule di strati cellulari basali e parabasali dell'epitelio con o senza colorazione di cellule degli strati cellulari superficiali ("metodo di colorazione diffusa"). Si assegna una valutazione "negativa" se il campione su vetrino colorato con p16^{Ink4a} mostra una reazione di colorazione negativa nell'epitelio ("metodo di colorazione negativa") o una colorazione di cellule isolate o piccoli ammassi cellulari; ovvero, una colorazione non continua, specialmente non di cellule basali e parabasali ("metodo di colorazione focale"); per CD 133, CD 166 e nestina è stato considerata significativa una positività dei campioni > 10%.

Tutti i campioni risultati positivi per p16^{Ink4a} sono stati sottoposti a genotipizzazione HPV mediante sistema INNO-LiPa.

2.4 Ricerca e tipizzazione dell'HPV.

I casi risultati positivi all' immunocolorazione per p16^{INK4a} sono stati genotipizzati per HPV (INNO-LiPA HPV Genotyping v2 Extra assay - Innogenetics Biotechnology for Healthcare, Gent, Belgium) mediante una metodica basata sull'uso dell'amplificazione PCR SPF10 e saggi di ibridazione LiPa, che identifica 28 differenti tipi HPV (HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70, 71, 73, 74 e 82) su materiale amplificato. Il set di primers SPF10 amplifica un frammento di 65-bp nella regione L1 "open reading frame", che consente di identificare almeno 54 tipi di HPV, conferendo alla metodica un'elevata sensibilità. I saggi di ibridazione avvengono su strisce di nitrocellulosa su cui sono presenti probes oligonucleotidici specifici e complementari dei 28 genotipi che si intende identificare; inoltre la strip è dotata di bande di controllo di reazione e ibridazione sia per il DNA umano che virale, oltre che del sistema UNG (uracil N-glicosilasi), che consente di ridurre i falsi positivi dovuti a contaminazioni di DNA già amplificato.

Per la ricerca e la tipizzazione dell'HPV, sono state tagliate quattro sezioni da 4 micron di tessuto paraffinato raccolte in eppendorf da 1,5 ml, previamente siglati. I campioni così ottenuti sono stati prima sparaffinati con 1ml di xilene e poi, dopo aver lavato le sezioni con alcool al 100% e lasciate asciugare a 37°C, sono stati incubati overnight, a 56°C, in 180 microlitri di Tween 20 allo 0,5%, 50 mM Tris-HCl pH8,5, 1 mM di acido etilenedianimotetraacetico, con l'aggiunta di 20 microlitri di proteinasi K (pK). Il giorno seguente la pK è stata inattivata tramite riscaldamento a 90°C per 60 minuti. Il campione così digerito è stato sottoposto ad estrazione di acido nucleico (DNA) tramite sistema su colonnina (QIAamp DNA FFPE Tissue, Qiagen, Valencia, Calif). L'amplificazione è stata eseguita su un termociclatore Mastercycler® (Eppendorf, Germania) e i prodotti della reazione sono stati analizzati su gel di agarosio all'3% e successivamente mediante sistema AutoBlot 3000H (MedTec Inc., Hillsborough, USA).

La SPF/PCR è stata condotta in un volume di reazione finale di 50 microlitri contenente 10 microlitri di DNA estratto e 40 microlitri di mix di amplificazione (10 mM Tris-HCl (H 9.0), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,01% gelatina, 200 mM di ogni desossinucleotide trifosfato, 15 pmol di ogni primer (forward and reverse), 1,5 U di AmpliTaq Gold (Perkin- Elmer) e uracile-N-glicosilasi-UNG-). Le condizioni per la PCR sono state le seguenti: degradazione dell'uracile contenuto nel DNA per 10 minuti a 37°, inattivazione di UNG e attivazione di AmpliTaq Gold per 9 minuti a 94°; poi, 40 cicli di 30 secondi a 94°C, 45 secondi a 52°C e 45 secondi a 72°C ed un hold finale a 72°C. Per i saggi LiPa 10 ml di prodotti della PCR biotinilati sono stati denaturati aggiungendo 10 ml di soluzione di denaturazione (soluzione alcalina contenente EDTA). Dopo 10 minuti, una o più strisce LiPa sono state inserite nel piatto contenitore e il tutto montato sullo strumento automatico AutoBlot 3000H, dopo aver preparato le soluzioni di denaturazione, di ibridazione, di coniugato e substrato e di lavaggio.

I risultati ottenuti, consistenti nella visualizzazione di una o più bande sulla striscia LiPa, sono stati interpretati mediante la comparazione del pattern di ibridazione con modelli standard tipo-specifici, utilizzando una sovrapposizione di acetato marcato con linee indicanti la posizione di ciascun probe rispetto al marker di riferimento.

2.5 Analisi statistica

I risultati riportati sono la media e la deviazione standard di esperimenti indipendenti.

La significatività statistica delle differenze tra i valori medi è stata calcolata mediante test T di Student. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $p \leq 0,05$. E' stato utilizzato il test di Cohen per la valutazione dei livelli di concordanza di espressione delle proteine su sezioni intere e su TMA, considerando come valori ottimali quelli $>0,7$.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma di valutazione statistica SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. RISULTATI

3.1 Popolazione studio

La stadiazione patologica post-operatoria dei 66 casi inclusi nella nostra popolazione-studio è stata effettuata secondo il sistema di classificazione dell' AJCC (American Joint Committee on Cancer 2009). Al momento dell' intervento chirurgico, 15 pazienti erano in stadio I (2 G1, 5 G2, 8 G3), 14 pazienti in stadio II (8 G2, 6 G3), 9 pazienti in stadio III (5 G2, 4 G3), 27 pazienti in stadio IVA (6 G1, 4 G2, 17) ed un paziente in stadio IVB (G3). Il tempo medio di follow-up è stato di 46,20 mesi (range: 12-131 mesi). Durante questo periodo, 2/66 pazienti hanno sviluppato recidiva; 2/66 hanno sviluppato metastasi a distanza, uno dei quali è morto per malattia; 5/66 hanno sviluppato sia recidiva che metastasi a distanza, 4 dei quali sono poi morti per malattia. Inoltre, 5/66 sono morti per malattia in assenza di evidenza di metastasi.

Ai fini della valutazione dei risultati delle indagini eseguite, i pazienti sono stati divisi in due gruppi: quelli con prognosi favorevole, che nel corso del follow-up non avevano sviluppato metastasi linfonodali e/o a distanza, recidiva e/o morte per malattia, e quelli con prognosi sfavorevole, che avevano presentato nel corso del follow-up almeno un evento negativo (recidiva e/o metastasi e/o morte per malattia).

Tutte le caratteristiche cliniche della popolazione, e morfologiche dei tumori, sono riportate nella Tab. I.

Il gruppo dei casi a prognosi sfavorevole comprendeva 14 pazienti, di età compresa tra 45 e 89 anni (età media: 65,21 anni), di cui 2 allo stadio I (2 G3), 3 allo stadio II (G2), 2 allo stadio III (2 G2), 6 allo stadio IVA (1 G1, 1 G2, 4 G3), 1 allo stadio IVB (G3). Il tempo medio di follow-up è stato di 32,57 mesi (range: 14-69) (Tab. II).

Il gruppo dei casi a prognosi favorevole comprendeva 52 pazienti, di età compresa tra 26 e 92 anni (età media: 57,35 anni) di cui 13 in stadio I (2 G1, 5 G2, 6 G3), 11 in stadio II

(5 G2, 6 G3), 7 in stadio III (3 G2, 4 G3) e 21 in stadio IVA (5 G1, 3 G2, 13 G3) (Tab. III).

3.2 Espressione di CAF-1/p60 nella popolazione studio

Tutti i casi di OSCC esaminati mostravano overespressione della proteina, con livelli compresi tra + e +++. In dettaglio, bassi livelli di espressione (+) sono stati trovati in 34 casi (51,51%) (5 G1, 15 G2, 14 G3), livelli moderati (++) in 17 casi (25,76%) (2 G1, 1 G2, 14 G3), e livelli elevati in 15 casi (22,73%) (1 G1, 6 G2, 8 G3), 14 dei quali (93%) avevano sviluppato, durante il follow-up, almeno un evento sfavorevole (ricidiva e/o metastasi e/o morte per malattia).

3.3 Espressione di CD166 nella popolazione studio

Circa la metà dei casi esaminati (31/66, 46,97%; 3 G1, 11 G2, 17 G3) mostrava livelli da moderati ad elevati di proteina e, in questo gruppo, erano compresi tutti i pazienti che, in corso di follow-up, avevano mostrato una prognosi peggiore. Tutti gli altri casi presentavano bassi livelli di CD166.

3.4 Espressione di Nestina nella popolazione studio

Nella popolazione selezionata, solo 17 casi (25,76%; 1 G1, 7 G2, 9 G3) esprimevano la proteina e, di questi 11 pazienti avevano sviluppato, in corso di follow-up, almeno un evento sfavorevole. Tutti gli altri 51 casi erano risultati negativi e, tra questi, solo 2 pazienti (2/51, 3,92%; 1 G2 ed 1 G3) avevano presentato recidiva a 6 e 5 mesi, rispettivamente.

3.5 Espressione di CD133 nella popolazione studio

Nella popolazione selezionata, 21 casi (21/66, 31,82%; 2 G1, 5 G2, 14 G3) esprimevano la proteina e, di questi, 9 (42,86%) pazienti avevano sviluppato, in corso di follow-up, almeno un evento sfavorevole. Tutti gli altri 45 casi erano risultati negativi e, tra questi, solo 5 pazienti (11,11%; 3 G2 ed 2 G3) avevano presentato almeno un evento sfavorevole.

3.6 Espressione di CD44 nella popolazione studio

Nella popolazione selezionata, 20 casi (30,3%; 1 G1, 8 G2, 11 G3) esprimevano la proteina e, di questi 11 pazienti avevano sviluppato, in corso di follow-up, almeno un evento sfavorevole. Tutti gli altri 49 casi erano risultati negativi e, tra questi, solo 3 pazienti (6,12%; 2 G2, 1 G3) avevano presentato almeno un evento sfavorevole.

3.7 Analisi statistica

L'analisi univariata ha evidenziato che una prognosi sfavorevole, intesa come l'occorrenza di almeno un evento sfavorevole, era significativamente correlata all'espressione di CAF1/p60 e dei markers di staminalità ed inversamente correlata alla presenza di infezione da HPV ($p < 0.01$). L'analisi di regressione multipla di Cox ha evidenziato che CAF-1, nestina e CD44 sono risultate le variabili in grado di predire in maniera più accurata un comportamento biologico sfavorevole ($p < 0.01$). Non erano presenti differenze statisticamente significative dei livelli di espressione di proteine nei diversi gradi e stadi delle lesioni ($p > 0.05$). Infine, non è stata trovata alcuna correlazione positiva tra l'outcome ed i parametri clinici valutati.

Il livello di concordanza della valutazione dell'espressione delle proteine testate, espresso mediante coefficiente di Cohen, era > 0.75 per la valutazione intra- ed interosservatore, sia su sezioni intere di tessuto che su TMA. Inoltre, anche la concordanza tra l'espressione delle proteine, osservata su sezioni intere e su TMA, è risultata ottima ($> 0,75$).

4. DISCUSSIONE

Il carcinoma squamoso rappresenta il 90% delle neoplasie maligne del cavo orale. Attualmente la stratificazione del rischio dei pazienti si basa esclusivamente sui classici parametri istopatologici che, tuttavia, non riescono a predire in maniera affidabile il comportamento biologico delle lesioni. Sino ad oggi, non è ancora disponibile, nella pratica clinica, né un singolo marcatore né una combinazione di marcatori^[42] in grado di discriminare, a parità di grading e staging, le lesioni che avranno un comportamento biologico favorevole da quelle a prognosi infausta.^[43-45] Tuttavia, la chirurgia rappresenta lo standard terapeutico delle lesioni in fase iniziale (localizzata). Tuttavia, nei casi avanzati essa lascia i pazienti sfigurati e con deficit funzionali ed implica un' ulteriore difficile chirurgia ricostruttiva. Inoltre, nelle fasi avanzate di progressione, gli OSCC spesso risultano resistenti a radio- e chemioterapia, che rappresentano l' opzione terapeutica non chirurgica per questo tipo di lesioni.^[46-47]

La conoscenza dei meccanismi biomolecolari alla base del processo di tumorigenesi è indispensabile per la formulazione e la messa a punto di strategie ottimali di prevenzione, diagnosi e terapia del cancro.

Attualmente, abbiamo raggiunto una soddisfacente visione “generale” del processo di trasformazione cellulare. Tuttavia, è noto che esistono differenze geno-fenotipiche responsabili del diverso comportamento biologico di neoplasie identiche dal punto di vista morfologico e/o di pari stadio.^[48] E' imperativo quindi individuare, per ogni tipo ed in ogni singolo caso di tumore, il/i set di alterazioni geno/fenotipiche in grado di predire il potenziale di aggressività biologica e la capacità metastatizzante della neoplasia.

Le modificazioni post-sintetiche del DNA e delle proteine della cromatina, interferendo con la struttura cromatinica e regolando l'accessibilità alle informazioni presenti sul

DNA, sono coinvolte nella patogenesi ed evoluzione di diverse neoplasie maligne umane.

L'identificazione e la riparazione dei danni del DNA si svolgono nel cosiddetto "ambiente cromatinico" nucleare ^[24,26], costituito da unità di base di DNA spiralizzato intorno ad ottametri istonici (nucleosomi) ^[24, 26-27] associati a proteine cromatiniche non istoniche ed a proteine leganti gli istoni.^[26] La regolazione della spiralizzazione della cromatina partecipa attivamente alla replicazione cellulare ed alla riparazione del DNA.^[27]

Il fattore 1 di assemblaggio cromatinico (CAF-1), svolge un ruolo unico, sia durante la replicazione che durante la riparazione del DNA, mediando il primo step della compattazione cromatinica attraverso l'assemblaggio dei nucleosomi, legando gli istoni H3 ed H4 al DNA neosintetizzato.^[28, 31]

Mentre la p48 (RbAp48) svolge prevalentemente un ruolo di cooperazione con la proteina Rb ^[26], le altre due subunità di CAF-1 svolgono più diretta azione regolatrice nei processi di replicazione e riparazione del DNA. In particolare la p60 è stata proposta come nuovo marker di proliferazione cellulare, con un grado di sensibilità maggiore rispetto ai marcatori tradizionali.^[34-37]

Nello studio attuale, abbiamo valutato immunoistochimicamente l'espressione di CAF 1/p60, allo scopo di verificare se l'alterazione dei meccanismi di DNA repair e di compattazione cromatinica fossero implicati nella carcinogenesi orale. In accordo a quanto dimostrato già in letteratura per altri tipi di neoplasie solide^[34-37], anche nella nostra popolazione studio di OSCC, CAF1/p60 si conferma come affidabile marker prognostico, essendo sempre over-espresso nei casi con outcome sfavorevole.

In letteratura si moltiplicano le segnalazioni che sostengono la teoria delle "**cancer stem cells**". Le cellule staminali normali dell'adulto (ACS) sono localizzate in diversi tessuti umani e rappresentano la base per l'omeostasi, il mantenimento ed il riparo tissutali,

come dimostrato, per esempio, nella cute^[49]. Queste cellule sono caratterizzate, in primis, dalla loro capacità di replicarsi attraverso “auto-renewal” ed, in seconda istanza, dalla loro abilità di generare cellule che differenzieranno nel tipo cellulare maturo del tessuto di origine.^[38]

Come è noto, le cellule staminali tendono ad essere più resistenti agli agenti citotossici delle cellule mature; caratteristica che può essere correlata alla loro relativa quiescenza, all’ attivazione di meccanismi anti-apoptotici o all’ elevata espressione di *ATP-binding cassette transporters* (ABC)^[39-41].

La “staminalità” di queste cellule, mediante un bilancio altamente regolato tra auto-rinnovamento e differenziazione, è mantenuta da pathways associati al “self-renewal”, come Wnt, Notch e hedgehog ^[50]. I tumori presentano una perdita di questo meccanismo omeostatico.^[50]

Le cellule staminali e le cellule neoplastiche “tumorigeniche” condividono alcune caratteristiche: entrambe le popolazioni possono mostrare elevata capacità proliferativa; inoltre, alcune delle caratteristiche delle cellule staminali, inclusa la plasticità cellulare, sono importanti ai fini della crescita di un tumore.

Nel loro insieme, queste considerazioni hanno portato al recente sviluppo della teoria delle “cancer stem cells” (CSC) che ipotizza che soltanto una frazione di cellule nell’ ambito di un tumore, le CSC appunto, sono essenziali per la sua progressione.

Considerate le forti similitudini tra le cellule staminali normali e tumorali, è plausibile che le CSC possano originare da alterazioni genetiche cumulative in cellule staminali normali che già posseggono, per loro natura, il meccanismo per indefinite “self-renewal”. Inoltre le CSCs potrebbero originare dalla trasformazione di progenitori cellulari o dalla “dedifferenziazione” di cellule in parte differenziate o, in ultima analisi, dalla trasformazione epigenetica di cellule staminali normali ad opera di un microambiente alterato. I markers di staminalità maggiormente utilizzati per identificare

questo subset cellulare, in diversi tipi di neoplasie ed, in particolar modo, nell'OSCC sono: la molecola di adesione cellulare dei leucociti attivati ALCAM/CD166, espressa dalle cellule staminali mesenchimali^[51]; CD133, una glicoproteina transmembrana che è espressa nelle cellule staminali emopoietiche, nei progenitori endoteliali, nelle cellule staminali capaci di differenziare nelle cellule neurali^[52]; la nestina, un filamento intermedio presente nel citoplasma di cellule staminali neuro epiteliali^[53-56], e CD44, una glicoproteina di superficie coinvolta nell'interazione cellula-cellula, adesione cellulare e migrazione.^[57-58] Abbiamo quindi valutato l'espressione di questi marcatori nella nostra serie di OSCC ed è emerso che i tumori con un outcome sfavorevole, esprimevano tutti i marcatori di staminalità testati, indicando che, nell'ambito di un tipo di neoplasia, i casi con “*fenotipo staminale*” rappresentano il sottogruppo più aggressivo e potenzialmente resistente alla terapia chemio- e radioterapica.

Inoltre, il dato interessante da sottolineare è che CAF1/p60 ed i markers di staminalità testati erano overespressi nello stesso subset di pazienti, consentendo di ipotizzare un risvolto terapeutico importante: farmaci diretti contro uno di questi markers, in particolare CAF1/p60, consentirebbe di colpire, oltre ai meccanismi di riparo cellulari CAF-mediati, anche quella sottopopolazione cellulare “staminale” responsabile dell'aggressività tumorale e, in associazione ai farmaci già disponibili, di aumentare la risposta alla terapia radio e chemioterapica.

Sulla stessa serie di campioni abbiamo quindi valutato, in ultima analisi, l'espressione della proteina p16^{INK4a}, come indicatore della presenza di infezione da HPV. Il genotipo identificato nei casi p16-positivi è stato il HPV-16 in tutti i pazienti.

I risultati del nostro studio sono risultati coerenti con i dati riportati letteratura: tutti i casi positivi per infezione da HPV hanno mostrato un outcome favorevole, indipendentemente dal grado di differenziazione e dallo stadio della malattia; infatti anche tra i casi morfologicamente “*aggressivi*”, scarsamente differenziati (G3), che,

generalmente, risultano associati con un outcome sfavorevole e con una scarsa risposta alla terapia, la presenza di infezione da HPV si è rivelata un fattore protettivo, associato ad un outcome favorevole. Tale dato indica che i pazienti con infezione da HR-HPV presentano un comportamento biologico favorevole ed una migliore risposta alla terapia rispetto ai pazienti HR-HPV-negativi. Sebbene non se ne conosca nei dettagli il meccanismo, alcuni autori ipotizzano che la miglior risposta alle attuali terapie radianti nei pazienti HPV+ sarebbe dovuta all'azione dell'oncoproteina virale E6, responsabile dell'inattivazione di p53 e, quindi, del mancato riparo dei danni al DNA.

In ultima analisi, abbiamo valutato la relazione tra infezione da HPV ed espressione degli altri marcatori esaminati ed è emersa una correlazione inversa tra la presenza di infezione virale ed overespressione degli altri markers testati.

In conclusione, il nostro studio evidenzia come l'effettuazione di un pannello immunoistochimico minimo, comprendente p16 come indicatore di infezione da HPV, un marker di riparazione del danno al DNA (CAF1/p60) e almeno due fra i più comuni marcatori di staminalità, ci può consentire, anche in una fase precoce del percorso diagnostico, di selezionare tra i carcinomi squamosi del cavo orale, la sottopopolazione ad elevatissimo rischio di progressione, indipendentemente dalle caratteristiche morfologiche della lesione, e di identificare quei pazienti che potrebbero usufruire di una terapia target che, associata alle terapie convenzionali attualmente disponibili, aumenterebbe la probabilità di risposta alla radio- e chemioterapia. Al contrario, l'identificazione dei pazienti positivi ad infezione da HPV e, quindi, con un outcome favorevole ed una migliore capacità di risposta alle terapie, consentirebbe di evitare un "over-treatment" in questa sottopopolazione di pazienti.

Da questo studio è, in ultima analisi, emersa un'elevata concordanza dei livelli di espressione delle diverse proteine testate su sezioni intere e su sezioni di TMA. Questo dato supporta l'utilità del metodo dei TMA come tecnica applicabile nello screening di

markers diagnostici e/o prognostici su tessuti neoplastici. La costruzione dei TMA è rapida e di facile esecuzione e, l' utilizzo di core di diametro adeguato (almeno 3 mm) consente una buona valutazione sia delle caratteristiche istologiche delle lesioni che della distribuzione e dell' intensità del segnale immunoistochimico. Pertanto, possiamo suggerire l' utilizzo della tecnica dei TMA come valido supporto nello screening di lesioni tumorali per markers biologici, con ampio risparmio di tempi e di risorse e con un' affidabilità sovrapponibile a quella ottenuta su sezioni intere.

BIBLIOGRAFIA

1. Al-Swiahb JN, Chen CH, Chuang HC, Fang FM, Tasi HT, Chien CY. Clinical, pathological and molecular determinants in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Future Oncol.* 2010 May;6(5):837-50
2. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug;61(4):212-36.
3. AIRTUM Working Group, Cancer prevalence in Italy Patients living with cancer, long-term survivors and cured patients, E&P, anno 34 (5-6), settembre-dicembre 2010, suppl.2
4. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidranski D. Pathology and genetics Head and Neck tumours. *World Health Classification of Tumours*, Lyon, 2005
5. Rodriguez T et al.: Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral oncol* 2004, 40(2):207-13
6. Macfarlane GJ, et al :Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies.*Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995, 31 B(3):181-7.
7. Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G . In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J Agric Food Chem* 2000; 48(5) 1449-1454
8. Rosenquist K, et al :Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 2005, 125 (12):1327-36
9. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman S M, Tsao A S, Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), *Head and Neck Oncology* 2010;2:15
10. Chow L T, Broker T R, Steinberg B M. The natural history of human papillomavirus infection of the mucosal epithelia. *APMIS* 2010; 118: 442-449

11. Feller L, Wood N H, Khammissa R AG, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head and Face Medicine* 2010; 6: 15
12. Syrjanen K, et al Morphological and immunoistochemical evidence suggesting human papilloma virus (HPV) involvement in oral squamous cell cacinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983, 12(6):418-24
13. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML: Case-control study of human papillomavirus and. oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 2007; 356 (19): 1944-1956
14. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R: Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2008, 100(6):407-420.
15. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zaharuk ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D: Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92:709-720. 12.
16. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, et al.: Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer research* 1998, 58(1):5-13.
17. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML: Improved survival of patients with human papillomaviruspositive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2008, 100(4):261-269

18. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX : Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*. 2002 Feb 28;21(10):1510-7
19. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al: Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 120:1731-1738, 2007.
20. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al: A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 121:2465-2472, 2007
21. Zhao D, Xu QG, Chen XM, Fan MW. Human papillomavirus as an independent predictor in oral squamous cell cancer. *Int J Oral Sci*. 2009 Sep;1(3):119-25;
22. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M, Liu FF. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6213-21.
23. Noma K, Allis CD, Grewall SI. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns as the heterochromatin domain boundaries. *Science*. 2001; 293:1150-5.
24. Merheineke K, Krude T. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 change during the cell division cycle. *J Biol Chem*. 1998; 273: 15279-15286.
25. Hoek M, Stillman B. CAF-1 is essential and couples chromatin assembly to DNA replication in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:12183-88.
26. Henikoff S. Versatile assembler. *Nature* 2003; 423: 814-17.
27. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y. H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 2004; 116: 51-61.

- 28.** Polo SE., Yheocharis SE., Klijaieko J., Savignoni A., Asselain B., Almouzni G., CAF-1, a marker of clinical value to distinguish quiescent from proliferative cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 2371
- 29.** Renan. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog.*1993: 139-146
- 30.** Taddei A, Roche D, Sibarita JB, Turner BM, Almouzni G. Duplication and maintenance of heterochromatin domains. *J Cell Biol* 1999; 147: 1153-66.
- 31.** Ye X, Franco AA, Santos H, Nelson DM, Kaufmann PD, Adams PD. Detective S phase chromatin assembly causes DNA damage, activation of the S phase checkpoint, and S phase arrest. *Mol Cell.* 2003; 11: 341-51.
- 32.** Moggs J, Grandi P, Quivy JP, Jonsson ZO, Almouzni G. A CAF-1-PCNA mediated Chromatin Assembly Pathway triggered by sensing DNA damage. *Molecular Cell Biology* 2002; 4:1206-18.
- 33.** Krude C. The kinetocore connection. *Current Biol* 2002; 12: 256-8
- 34.** Mascolo M, Vecchione ML, Ilardi G, Scalvenzi M, Molea G, Di Benedetto M, Nugnes L, Siano M, De Rosa G, Staibano S., Overexpression of Chromatin Assembly Factor-1/p60 helps to predict the prognosis of melanoma patients. *BMC Cancer.* 2010 Feb 24;10:63.
- 35.** Staibano S, Mascolo M, Mancini FP, Kisslinger A, Salvatore G, Di Benedetto M, Chieffi P, Altieri V, Prezioso D, Ilardi G, De Rosa G, Tramontano D., Overexpression of chromatin assembly factor-1 (CAF-1) p60 is predictive of adverse behaviour of prostatic cancer. *Histopathology.* 2009 Apr;54(5):580-9.
- 36.** Staibano S, Mignogna C, Lo Muzio L, Mascolo M, Salvatore G, Di Benedetto M, Califano L, Rubini C, De Rosa G. Chromatin assembly factor-1 (CAF-1)-mediated regulation of cell proliferation and DNA repair: a link with the biological behaviour of squamous cell carcinoma of the tongue? *Histopathology.* 2007 Jun;50(7):911-9.

37. Staibano S, Mascolo M, Rocco A, Lo Muzio L, Ilardi G, Siano M, Pannone G, Vecchione ML, Nugnes L, Califano L, Zamparese R, Bufo P, De Rosa G. The proliferation marker Chromatin Assembly Factor-1 is of clinical value in predicting the biological behaviour of salivary gland tumours. *Oncol Rep*. 2011 Jan;25(1):13-22.
38. Harrison DE, Lerner CP. Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood*. 1991 Sep 1;78(5):1237-40.
39. Peters R, Leyvraz S, Perey L. Apoptotic regulation in primitive hematopoietic precursor *Blood*. 1998 Sep 15;92(6):2041-52.
40. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med*. 2001 Sep;7(9):1028-34.
41. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):700-7.
42. Maarten P. Tabor, Ruud H. Brakenhoff, Henrique J. Ruijter-Schippers, Jacqueline E. van der Wal, Gordon B. Snow, C. René Leemans and Boudewijn J. M. Braakhuis. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002; 161: 1051-1060.
43. Zuckerberg L. The molecular basis of dysplasia. *Semin Diagn Pathol* 2002; 19: 48-53.
44. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. Atlas of tumor pathology-tumors of the larynx, 3rd series. Washington: Armed Force Institute of Pathology; 1992.
45. Johnson FL. Management of advanced premalignant laryngeal lesions. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; 11: 462-6.
46. Schuller DE, Wilson HE, Smith RE, Batley F, James AD. Preoperative reductive chemotherapy for locally advanced carcinoma of the oral cavity, oropharynx, and hypopharynx. *Cancer* 1983; 51: 15-19.

47. Al-Sarraf M. Chemotherapy strategies in squamous cell carcinoma of the head and neck. *CRC Crit Rev Oncol Hematol* 1983; 1: 323–355.
48. Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH. Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann NY Acad Sci.* 2004; 1028: 192-201.
49. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):105-11.
50. Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):349-54.
51. Sawhney M, Matta A, Macha MA, Kaur J, DattaGupta S, Shukla NK, Ralhan R
Cytoplasmic accumulation of activated leukocyte cell adhesion molecule is a predictor of disease progression and reduced survival in oral cancer patients. *Int J Cancer.*2009 May 1;124 (9):2098-105.
52. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy *Cancer Lett.* 2010 Mar 28;289(2):151-60. Epub 2009 Sep 11
53. Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 2004 Oct;61(19-20):2510-22.
54. Mokřý J, Cízková D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D. Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.* 2004 Dec;13(6):658-64
55. Su W, Chen J, Yang H, You L, Xu L, Wang X, Li R, Gao L, Gu Y, Lin S, Xu H, Breyer MD, Hao CM. Expression of nestin in the podocytes of normal and diseased human kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 May;292(5):R1761-7. Epub 2007 Jan 25
56. Perry J, Ho M, Viero S, Zheng K, Jacobs R, Thorner PS. The intermediate filament nestin is highly expressed in normal human podocytes and podocytes in glomerular disease. *Pediatr Dev Pathol.* 2007 Sep-Oct;10(5):369-82

- 57.** Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2011 Nov 7.
- 58.** Kokko LL, Hurme S, Maula SM, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I, Ventelä S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2011 Jun;47(6):510-6

TABELLE

Tab. I Dati clinico-patologici della popolazione studio

PAZIENTE	SESSO	ETA'	GRADO	STADIO	FOLLOW UP	CAF-1/p60	p16	HPV	CD 166	CD133	NESTIN	CD 44
1	M	45	G1	IVA	73	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
2	M	54	G1	IVA	94	++	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
3	M	60	G1	IVA	45	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
4	M	63	G1	IVA	131	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
5	M	67	G1	I	34	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
6	F	68	G1	I	39	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
7	M	68	G1	IVA	127	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
8	F	81	G1	IVA	14 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
9	F	29	G2	II	67	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
10	F	30	G2	I	49	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
11	F	35	G2	III	13	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
12	M	37	G2	I	60	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
13	M	40	G2	III	41	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
14	M	40	G3	II	67	++	POS	16	+	NEG	NEG	POS
15	M	40	G3	II	77	+	POS	16	-	NEG	POS	NEG
16	M	50	G2	II	18 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
17	M	51	G2	IVA	51	+	NEG	-	++	POS	NEG	POS
18	F	55	G2	II	28	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
19	M	50	G3	III	65	+	POS	16	+	POS	NEG	NEG
20	M	58	G2	III	16 (M, DFD)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
21	M	59	G2	I	41	+	NEG	-	++	NEG	NEG	POS
22	M	60	G2	III	30 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	++	POS	POS	POS
23	M	61	G2	II	79	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
24	M	64	G2	II	23 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
25	M	65	G2	IVA	70	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
26	M	65	G2	III	124	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
27	M	66	G2	II	92	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
28	M	68	G2	I	24	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
29	M	69	G2	II	58 (M)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
30	F	70	G2	IVA	17	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
31	F	75	G2	I	46	+	NEG	-	++	POS	NEG	NEG
32	F	80	G2	II	41	++	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
33	F	89	G2	IVA	12 (R)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
34	M	30	G3	I	45	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
35	F	33	G3	IVA	75	++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
36	M	45	G3	I	28 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
37	M	45	G3	III	19	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
38	M	46	G3	IVA	54	+++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
39	M	46	G3	IVA	54	++	POS	16	++	NEG	NEG	NEG
40	F	50	G3	IVA	32 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
41	M	51	G3	IVA	102	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
42	M	53	G3	IVA	39	++	NEG	-	++	POS	NEG	NEG
43	F	55	G3	I	34	+	NEG	-	++	NEG	NEG	POS
44	M	56	G3	IVA	39	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
45	M	57	G3	I	65 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
46	F	58	G3	IVA	30	++	NEG	-	++	POS	NEG	NEG
47	M	59	G3	I	42	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
48	F	60	G3	I	12	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
49	F	61	G3	IVA	13	++	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
50	F	65	G3	IVA	42 (R, M)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
51	M	26	G3	III	90	+	POS	16	-	NEG	POS	POS
52	M	38	G3	IVA	24	++	POS	16	+	POS	NEG	NEG
53	M	44	G3	I	33	+	POS	16	-	NEG	POS	NEG
54	M	75	G3	I	46	+	POS	16	+	POS	NEG	NEG
55	M	73	G3	IVB	23 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
56	M	73	G3	II	12	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
57	M	75	G3	IVA	69 (R)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
58	M	75	G3	III	29	++	NEG	-	++	NEG	NEG	POS
59	M	77	G3	IVA	26 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
60	F	77	G3	IVA	50	++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
61	M	77	G3	II	17	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
62	F	77	G3	IVA	22	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
63	F	77	G3	IVA	37	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
64	M	78	G3	IVA	25	++	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
65	I	79	G3	II	15	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
66	F	92	G3	II	40	++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG

Tab. II Dati clinico-patologici dei pazienti con prognosi sfavorevole

PAZIENTE	SESSO	ETA'	GRADO	STADIO	FOLLOW UP	CAF-1/p60	p16	HPV	CD 166	CD133	NESTIN	CD 44
8	F	81	G1	IVA	14 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
16	M	50	G2	II	18 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
20	M	58	G2	III	16 (M, DFD)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
22	M	60	G2	III	30 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	++	POS	POS	POS
24	M	64	G2	II	23 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
29	M	69	G2	II	58 (M)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
33	F	89	G2	IVA	12 (R)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
36	M	45	G3	I	28 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
40	F	50	G3	IVA	32 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
45	M	57	G3	I	65 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
50	F	65	G3	IVA	42 (R, M)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
55	M	73	G3	IVB	23 (R, M, DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS
57	M	75	G3	IVA	69 (R)	+++	NEG	-	++	NEG	POS	POS
59	M	77	G3	IVA	26 (DFD)	+++	NEG	-	+++	POS	POS	POS

Tab. III Dati clinico-patologici dei pazienti con prognosi favorevole

PAZIENTE	SESSO	ETA'	GRADO	STADIO	FOLLOW UP	CAF-1/p60	p16	HPV	CD 166	CD133	NESTIN	CD 44
1	M	45	G1	IVA	73	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
2	M	54	G1	IVA	94	++	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
3	M	60	G1	IVA	45	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
4	M	63	G1	IVA	131	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
5	M	67	G1	I	34	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
6	F	68	G1	I	39	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
7	M	68	G1	IVA	127	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
9	F	29	G2	II	67	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
10	F	30	G2	I	49	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
11	F	35	G2	III	13	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
12	M	37	G2	I	60	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
13	M	40	G2	III	41	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
14	M	40	G3	II	67	++	POS	16	+	NEG	NEG	POS
15	M	40	G3	II	77	+	POS	16	-	NEG	POS	NEG
17	M	51	G2	IVA	51	+	NEG	-	++	POS	NEG	POS
18	F	55	G2	II	28	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
19	M	50	G3	III	65	+	POS	16	+	POS	NEG	NEG
21	M	59	G2	I	41	+	NEG	-	++	NEG	NEG	POS
23	M	61	G2	II	79	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
25	M	65	G2	IVA	70	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
26	M	65	G2	III	124	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
27	M	66	G2	II	92	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
28	M	68	G2	I	24	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
30	F	70	G2	IVA	17	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
31	F	75	G2	I	46	+	NEG	-	++	POS	NEG	NEG
32	F	80	G2	II	41	++	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
34	M	30	G3	I	45	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
35	F	33	G3	IVA	75	++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
37	M	45	G3	III	19	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
38	M	46	G3	IVA	54	+++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
39	M	46	G3	IVA	54	++	POS	16	++	NEG	NEG	NEG
41	M	51	G3	IVA	102	+	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
42	M	53	G3	IVA	39	++	NEG	-	++	POS	NEG	NEG
43	F	55	G3	I	34	+	NEG	-	++	NEG	NEG	POS
44	M	56	G3	IVA	39	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
46	F	58	G3	IVA	30	++	NEG	-	++	POS	NEG	NEG
47	M	59	G3	I	42	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
48	F	60	G3	I	12	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
49	F	61	G3	IVA	13	++	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
51	M	26	G3	III	90	+	POS	16	-	NEG	POS	POS
52	M	38	G3	IVA	24	++	POS	16	+	POS	NEG	NEG
53	M	44	G3	I	33	+	POS	16	-	NEG	POS	NEG
54	M	75	G3	I	46	+	POS	16	+	POS	NEG	NEG
56	M	73	G3	II	12	+	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
58	M	75	G3	III	29	++	NEG	-	++	NEG	NEG	POS
60	F	77	G3	IVA	50	++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG
61	M	77	G3	II	17	+	NEG	-	+	POS	NEG	NEG
62	F	77	G3	IVA	22	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
63	F	77	G3	IVA	37	+	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
64	M	78	G3	IVA	25	++	NEG	-	+	NEG	NEG	NEG
65	I	79	G3	II	15	++	POS	16	+	NEG	NEG	NEG
66	F	92	G3	II	40	++	NEG	-	++	NEG	NEG	NEG

ICONOGRAFIA

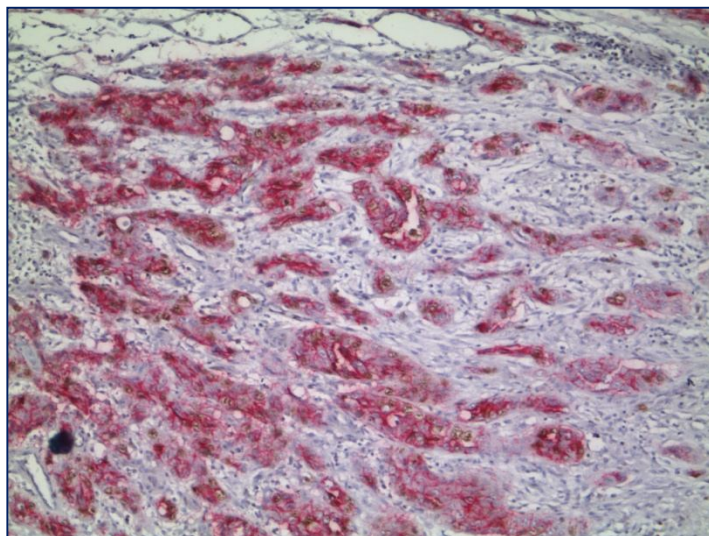


Fig.8a

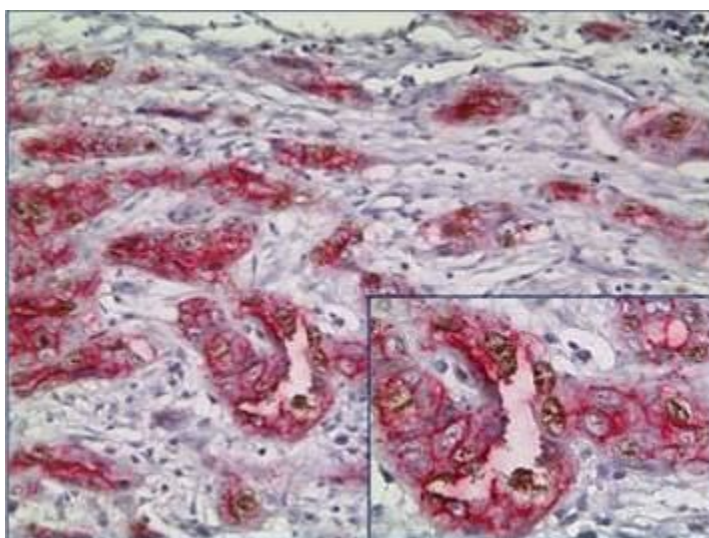


Fig.8b

Fig. 8 a,b. Espressione immunoistochimica di CAF1/p60 (segnale nucleare) e CD44 (segnale di membrana) in un caso di OSCC moderatamente differenziato (G2) che ha sviluppato metastasi e morte per malattia (cfr. caso n. 20)

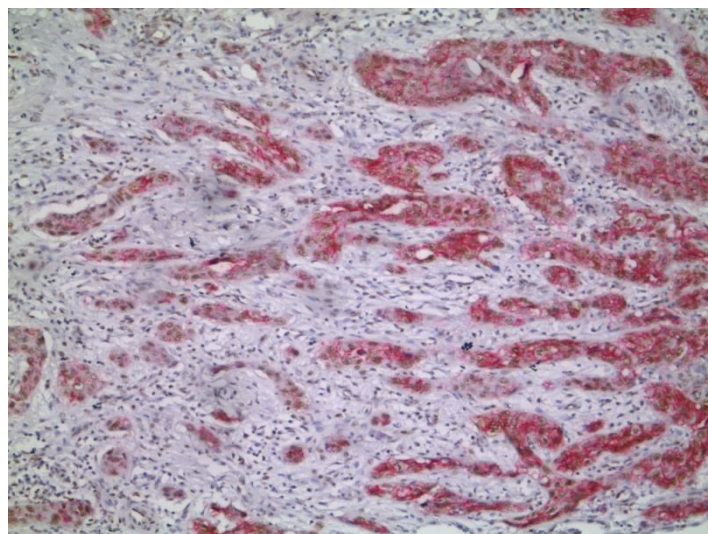


Fig.9a

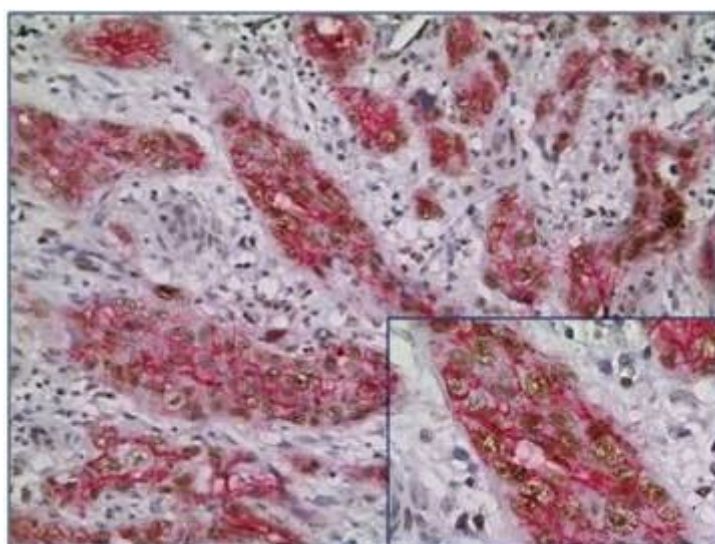


Fig.9b

Fig. 9 a,b. Espressione immunoistochimica di CAF1/p60 (segnale nucleare) e CD166 (segnale di membrana e citoplasmatica) in un caso di OSCC moderatamente differenziato (G2) che ha sviluppato metastasi e morte per malattia (cfr. caso n. 20)

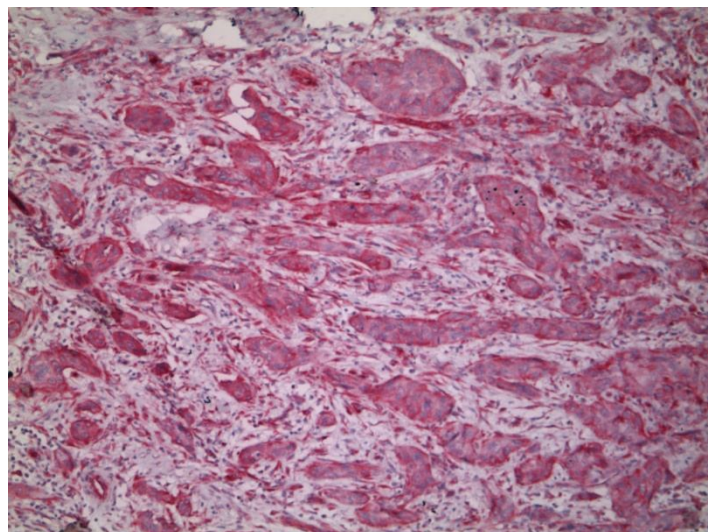


Fig.10a

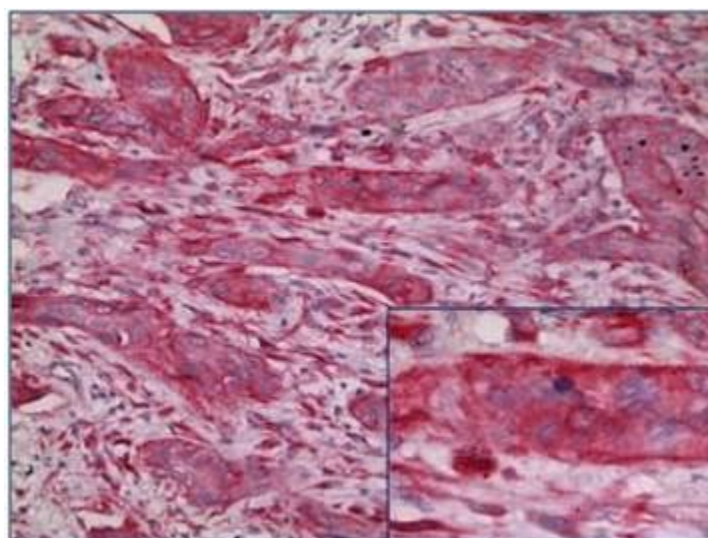


Fig.10b

Fig. 10 a,b. Espressione immunoistochimica di CAF1/p60 (segnale nucleare) e nestina (segnale di membrana) in un caso di OSCC moderatamente differenziato (G2) che ha sviluppato metastasi e morte per malattia (cfr. caso n. 20)

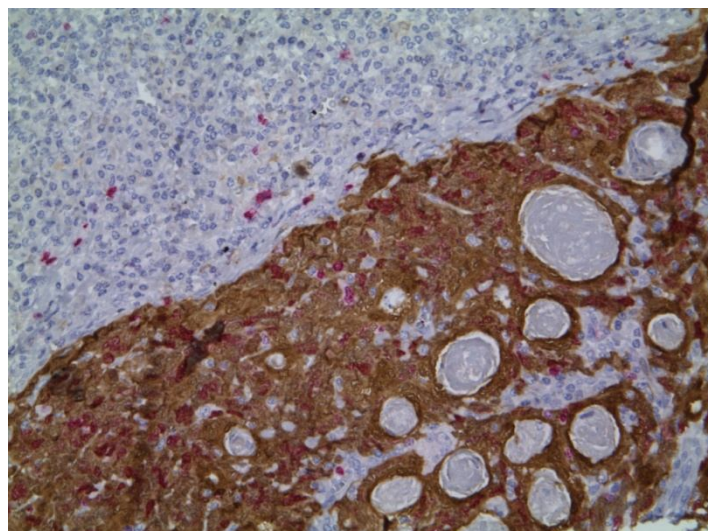


Fig.11a

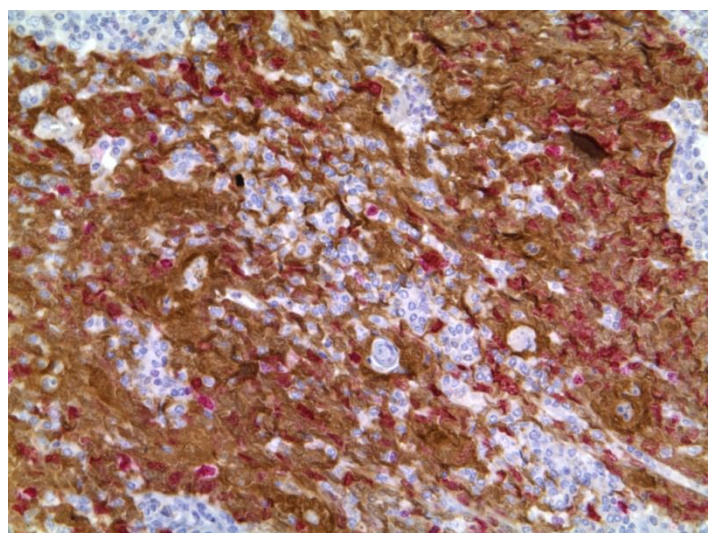


Fig.11b

Fig. 11 a,b. Espressione immunoistochimica di proteina p16^{INK4A} in un caso di OSCC da moderatamente a scarsamente differenziato (G2/G3) con prognosi favorevole (cfr. caso n. 34)

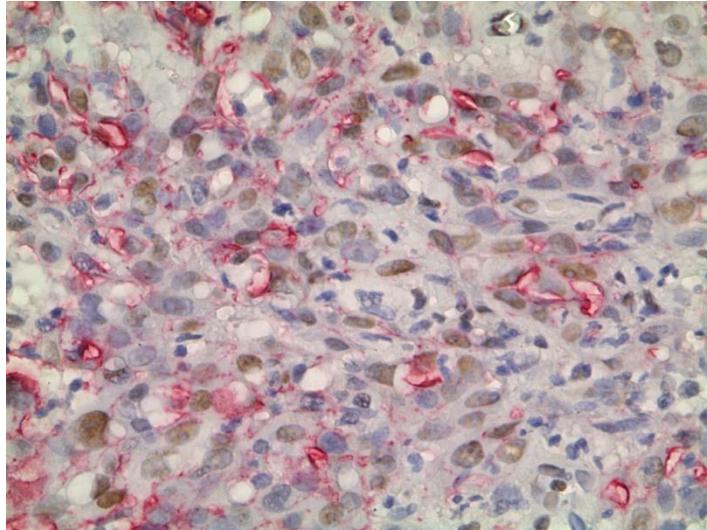


Fig12

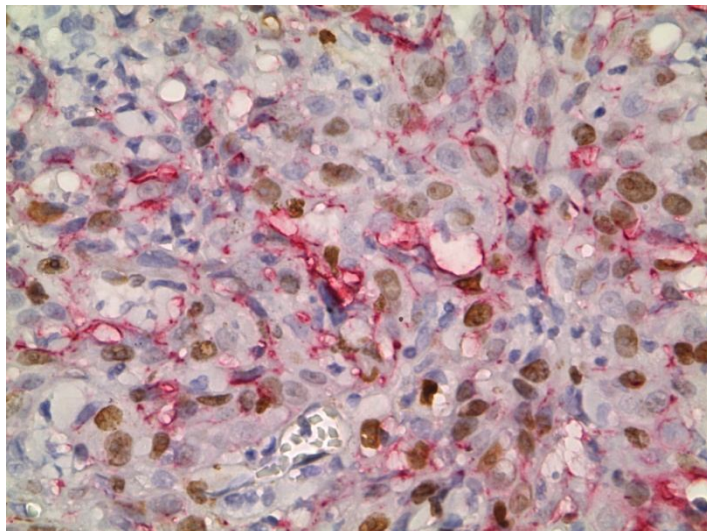


Fig.13

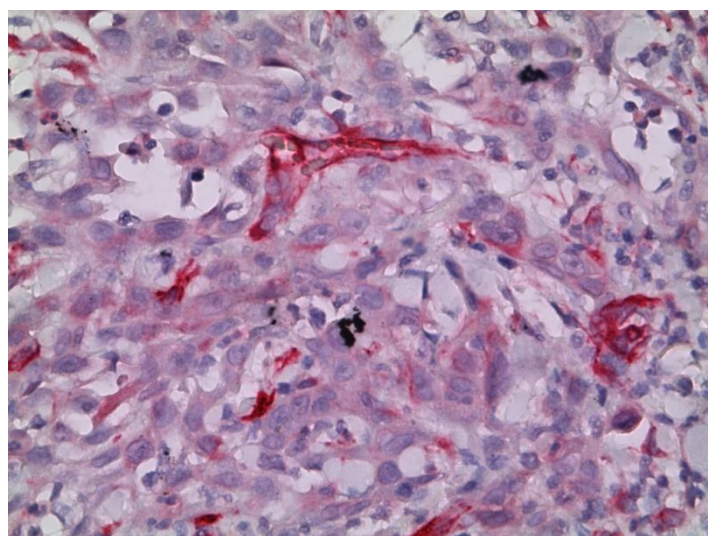


Fig.14

Fig. 12, 13, 14. Bassi livelli di espressione/assenza di segnale rispettivamente di CAF1/p60 e CD44, CAF1/p60 e CD166, e nestina in un caso di OSCC da moderatamente a scarsamente differenziato (G2/G3) con prognosi favorevole, risultato positivo per infezione da HPV16 (cfr. caso n. 34)